[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

اولین بررسی فیلوژنتیکی گونه‌ی

(Mollusca: Nudibranchia) *Goniobranchus annulatus*

در آبهای ناحیه زیر جزر و مدی خلیج چابهار

براساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز C زیر واحد I

گیلان عطاران فریمان* و یاسمن موسوی پور

g.attaran@sum.ac.ir

دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، گروه زیست شناسی دریا، چابهار ، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۲

چکیده

برهنه آبششان (Nudibranch) بزرگترین گروه از ناجور آبششان (Heterobranch) و در زیر رده‌ی عقب آبششان (Opisthobranchia) قرار گرفته‌اند، پراکنشی جهانی دارند و در تمامی آبهای دنیا از مناطق بین جزر و مدی تا اعماق دریا و از مناطق قطبی تا مناطق گرمسیر دیده می‌شوند. برهنه آبششان در دو گروه اصلی Anthobranchia و Cladobranchia قرار گرفته‌اند. گونه‌ی مورد مطالعه در این بررسی از لحاظ مورفولوژی *Goniobranchus annulatus* شناسایی گردیدکه جز گروه Anthobranchia می‌باشد.در آنالیز مولکولی توالی قسمتی از ژن COI میتوکندریایی گونه *G. annulatus* از ایران با ۱۵ برهنه آبشش دیگر از بانک ژن که از لحاظ توالی ژنتیکی به گونه مورد بررسی نزدیک می‌باشند، مقایسه گردید. بررسی فیلوژنتیکی براساس آنالیز Neighbor _joining روابط منوفایلتیک بین خانواده‌های برهنه آبششان و روابط خواهری بین گونه‌ی *Goniobranchus annulatus* ازایران و گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* را با حمایت ۱۰۰ درصد بوت استرپ نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: نرمتنان، شکمپایان، رده بندی، COI , سواحل چابهار

مقدمه

شکم‌پایان یکی از گروههای تخصص یافته‌ی متازوآ می‌باشد و مطالعات زیادی روی آنها صورت گرفته است. اما مطالعه فیلوژنی آنها از سال ۱۹۸۸ انجام شد (Haszprunar & Huber, 2005). برهنه آبششان بزرگترین گروه heterobranchها در کلاد Euthyneura، در زیر رده‌ی Opisthobranchia جز راسته‌ی Nudibranchia، در گروه شکم‌پایان قرار گرفته‌اند.

*Corresponding author

سیستماتیک دقیق برهنه آبششان در سالهای اخیر موضوع بسیاری از مطالعات رده‌بندی بوده است. با اینکه در سالهای اخیر منوفایلتیک بودن Heterobranchia به اثبات رسیده است با این وجود منوفایلتیک بودن گروههای Euthyneura، Opisthobranchia و Pulmonata رد شده است (Dinapoli, 2009). از سال ۲۰۰۵ به بعد pleurobranchها (که قبلا جز گروه sidegill slugها طبقه‌بندی می‌شدند) در کنار برهنه آبششان در کلاد Nudipleura قرار گرفت. از سال ۲۰۱۰ به بعد، این موضوع که Opisthobranchia یک کلاد پارافایلتیک و نامعتبر است به رسمیت شناخته شد و بجای آن Nudipleura بعنوان شاخه اول Euthyneura (کلاد غالب گاستروپودها) شناخته شده است (Guido *et al.*, 2006). در حدود ۲۰۰ سال پیش برهنه آبششان در دو گروه اصلی قرار داده شدند که شامل: dorid برهنه آبششان (Anthobranchia) و aeolid برهنه آبششان (Cladobranchia) می‌باشند (Wollscheid *et al.*, 2001). در گروه Cladobranchia Odhner, 1934 سه تاکسون اصلی شامل Dendronotoidea، Arminoidea و Aeolidoidea. شناسایی شده است و درگروه Anthobranchia فقط راسته‌ی Doridoidea گزارش شده است. راسته‌ی Doridoidea شامل دو تاکسون خواهریاست و در تقسیم بندی‌های جدیدتری که بر روی این راسته انجام شد سرانجام راسته‌های جدید Bathydoridoidea هم معرفی گردید (Wägele, 1989). آنالیزهای مولکولی انجام شده منوفایلتیک بودن دو گروه Anthobranchia و Cladobranchia را به اثبات رسانیده است (Wollscheid & Wägele, 1999). برهنه آبششان با داشتن ۳۰۰۰ گونه بزرگترین گروه از heterobranchs است. این گروه بعد از طی مراحل لاروی صدف و پوسته خود را از دست داده‌اند. بطور کلی این دسته از موجودات با این شکل ظاهری را حلزون‌های بی صدف (Sea slug) می‌نامند . اما بسیاری از این حلزون‌های بی صدف در گروههایی تقسیم‌بندی شده‌اند که متعلق به برهنه آبششان نمی‌باشد. این گروه یک پراکنش جهانی دارند و در تمامی آبهای دنیا از مناطق بین جزر و مدی گرفته تا اعماق دریا و از مناطق قطبی تا مناطق استوایی دیده می‌شوند و با داشتن اشکال متفاوت و رنگهای متنوع بسیار قابل توجه بوده‌اند (Thompson, 2009). اغلب مطالعات فیلوژنتیکی که روی خانواده Nudibranchia انجام شده است با استفاده از قطعات ژنوم میتوکندریایی بوده است. برای مثال Thollesson (۲۰۰۰) با استفاده از دو توالی ژنی میتوکندریایی که شامل 16S rRNA و COI است، برهنه آبششان Dorid را مورد آنالیز مولکولی قرار داد . یک ناحیه با ۶۵۸bp مربوط به زیر واحد سیتوکروم c اکسیداز میتوکندریایی (COI) که در مطالعات مولکولی و فیلوژنتیک استفاده گسترده‌ای داشته است (Hebert *et al.*, 2003)، از نواحی ژنی است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است. جنس *Goniobranchus* بواسطه نحوه آرایش آبششها که به شکل یک خوشه در قسمت خلفی بدن در اطراف مقعد قرار گرفته‌اند جز Doridها شناسایی شده‌اند (*Guido et al.,* 2006) در این پژوهش گونه‌ای از جنس *Goniobranchus* از سواحل چابهار برای اولین بار با هدف شناسایی گونه‌ای تحت آنالیز مولکولی قرار گرفته است و توالی ژنی آن با گونه‌های مشابه مورد مقایسه قرار گرفته و فیلوژنی آن مشخص گردید.

مواد و روش کار

پس از بررسی منطقه و تعیین ایستگاههای تیس، اسکله شهید بهشتی، اسکله صیادی چابهار و اسکله شهید کلانتری در اردیبهشت ۱۳۹۱، تعداد ۵ نمونه از این نرمتن از منطقه زیر جزر و مدی توسط غواصی جمع‌آوری گردید (شکل ۱). نمونه‌ها جهت انجام عملیات آزمایشگاهی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انتقال داده شدند. پس از بررسی‌های موفولوژی، استخراج DNA از پاهای شکمی موجود صورت گرفت، بدین منظور پاهای شکمی نمونه‌ها بلافاصله جداسازی و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند (Thollesson, 2000). تکه‌های کوچک جدا شده از پاهای شکمی موجود را توسط ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (2% CTAB ,1.4M NaCl , 0.1% β_mercaptooethanol دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل RS232C مورد سنجش قرار گرفت. باندهای DNA با استفاده از دستگاه ژل داک مدل E_BOX_VX2/2M بررسی و سپس DNA استخراج شده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد.

بسط و توسعه قسمتی از ژن میتوکندریایی COI با استفاده از آغازگرهای‌های LCO1490f , HCO2198r انجام گرفت (Galil *et al.*, 2010). هر واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Ependorf 5331 انجام شد . در هر

سیستماتیک دقیق برهنه آبششان در سالهای اخیر موضوع بسیاری از مطالعات رده‌بندی بوده است. با اینکه در سالهای اخیر منوفایلتیک بودن Heterobranchia به اثبات رسیده است با این وجود منوفایلتیک بودن گروههای Euthyneura، Opisthobranchia و Pulmonata رد شده است (Dinapoli, 2009). از سال ۲۰۰۵ به بعد pleurobranchها (که قبلا جز گروه sidegill slugها طبقه‌بندی می‌شدند) در کنار برهنه آبششان در کلاد Nudipleura قرار گرفت. از سال ۲۰۱۰ به بعد، این موضوع که Opisthobranchia یک کلاد پارافایلتیک و نامعتبر است به رسمیت شناخته شد و بجای آن Nudipleura بعنوان شاخه اول Euthyneura (کلاد غالب گاستروپودها) شناخته شده است (Guido *et al.*, 2006). در حدود ۲۰۰ سال پیش برهنه آبششان در دو گروه اصلی قرار داده شدند که شامل: dorid برهنه آبششان (Anthobranchia) و aeolid برهنه آبششان (Cladobranchia) می‌باشند (Wollscheid *et al.*, 2001). در گروه Cladobranchia Odhner, 1934 سه تاکسون اصلی شامل Dendronotoidea، Arminoidea و Aeolidoidea. شناسایی شده است و درگروه Anthobranchia فقط راسته‌ی Doridoidea گزارش شده است. راسته‌ی Doridoidea شامل دو تاکسون خواهریاست و در تقسیم بندی‌های جدیدتری که بر روی این راسته انجام شد سرانجام راسته‌های جدید Bathydoridoidea هم معرفی گردید (Wägele, 1989). آنالیزهای مولکولی انجام شده منوفایلتیک بودن دو گروه Anthobranchia و Cladobranchia را به اثبات رسانیده است (Wollscheid & Wägele, 1999). برهنه آبششان با داشتن ۳۰۰۰ گونه بزرگترین گروه از heterobranchs است. این گروه بعد از طی مراحل لاروی صدف و پوسته خود را از دست داده‌اند. بطور کلی این دسته از موجودات با این شکل ظاهری را حلزون‌های بی صدف (Sea slug) می‌نامند . اما بسیاری از این حلزون‌های بی صدف در گروههایی تقسیم‌بندی شده‌اند که متعلق به برهنه آبششان نمی‌باشد. این گروه یک پراکنش جهانی دارند و در تمامی آبهای دنیا از مناطق بین جزر و مدی گرفته تا اعماق دریا و از مناطق قطبی تا مناطق استوایی دیده می‌شوند و با داشتن اشکال متفاوت و رنگهای متنوع بسیار قابل توجه بوده‌اند (Thompson, 2009). اغلب مطالعات فیلوژنتیکی که روی خانواده Nudibranchia انجام شده است با استفاده از قطعات ژنوم میتوکندریایی بوده است. برای مثال Thollesson (۲۰۰۰) با استفاده از دو توالی ژنی میتوکندریایی که شامل 16S rRNA و COI است، برهنه آبششان Dorid را مورد آنالیز مولکولی قرار داد . یک ناحیه با ۶۵۸bp مربوط به زیر واحد سیتوکروم c اکسیداز میتوکندریایی (COI) که در مطالعات مولکولی و فیلوژنتیک استفاده گسترده‌ای داشته است (Hebert *et al.*, 2003)، از نواحی ژنی است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است. جنس *Goniobranchus* بواسطه نحوه آرایش آبششها که به شکل یک خوشه در قسمت خلفی بدن در اطراف مقعد قرار گرفته‌اند جز Doridها شناسایی شده‌اند (*Guido et al.,* 2006) در این پژوهش گونه‌ای از جنس *Goniobranchus* از سواحل چابهار برای اولین بار با هدف شناسایی گونه‌ای تحت آنالیز مولکولی قرار گرفته است و توالی ژنی آن با گونه‌های مشابه مورد مقایسه قرار گرفته و فیلوژنی آن مشخص گردید.

مواد و روش کار

پس از بررسی منطقه و تعیین ایستگاههای تیس، اسکله شهید بهشتی، اسکله صیادی چابهار و اسکله شهید کلانتری در اردیبهشت ۱۳۹۱، تعداد ۵ نمونه از این نرمتن از منطقه زیر جزر و مدی توسط غواصی جمع‌آوری گردید (شکل ۱). نمونه‌ها جهت انجام عملیات آزمایشگاهی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انتقال داده شدند. پس از بررسی‌های موفولوژی، استخراج DNA از پاهای شکمی موجود صورت گرفت، بدین منظور پاهای شکمی نمونه‌ها بلافاصله جداسازی و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند (Thollesson, 2000). تکه‌های کوچک جدا شده از پاهای شکمی موجود را توسط ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (2% CTAB ,1.4M NaCl , 0.1% β_mercaptooethanol دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل RS232C مورد سنجش قرار گرفت. باندهای DNA با استفاده از دستگاه ژل داک مدل E_BOX_VX2/2M بررسی و سپس DNA استخراج شده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد.

بسط و توسعه قسمتی از ژن میتوکندریایی COI با استفاده از آغازگرهای‌های LCO1490f , HCO2198r انجام گرفت (Galil *et al.*, 2010). هر واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Ependorf 5331 انجام شد . در هر

میکرولیتر پروتئیناز K و ۱/۴ میکرولیتر β mercapthonal_ در یک میکروتیوب با هم ترکیب کرده و به حالت سوسپانسون در آمدند. پس از انکوباسیون و سانتریفیوژ، کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴:۱) اضافه شد، بسته به مقدار رسوب DNA، آب دیونیزه اضافه شد و DNA استخراجی برای مطالعات بعدی در فریزر۲۰- نگه‌داری شد کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱درصد با دستگاه الکتروفورز و کمیت آن هم با استفاده از

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

واکنش ۱۵ نانوگرم DNA استخراج شده در حجمی ۵۰ میکرولیتری بعنوان نمونه الگو استفاده شد .

در این واکنش علاوه بر DNA استخراجی، 10 x PCR, Buffer $Mgcl_2$، dNTP ، آغازگرها و Taq DNA polymeras مورد استفاده قرار گرفتند. در سیکل حرارتی داده شده به دستگاه PCR، در ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و بدنبال آن در یک سیکل ۳۸ تایی که شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در آخر با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سیکل حرارتی پایان داده می‌شود . پس از اطمینان از صحت محصول PCR و تکثیر باندهای مورد نظر به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱درصد، نمونه‌ها پس از clean up، برای تعیین توالی به کشور کانادا فرستاده شدند و نتایج بدست آمده از تعیین توالی محصولات با استفاده از نرم افزارهای مرتبط مورد آنالیزهای فیلوژنتیکی قرار گرفت .

در این پژوهش از نرم‌افزارهای (Kumar *et al.*, 1994) MEGA Ver 5، (Hall, 1999) BioEdit Ver 7.0 و ClustalX (Jeanmougin *et al.*, 1998) استفاده شد. در ابتدا کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نمونه‌های رفت و برگشت، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و بصورت چشمی ویرایش شده سپس توالی‌های مورد اشاره با استفاده از نرم افزار Clustal X هم ردیف گردیدند. سپس ماتریس داده‌های هم ردیف سازی شده برای هر دو قطعه مورد نظر DNA مورد نظر به کمک نرم افزار MEGA تجزیه و تحلیل گردید. به منظور بررسی فیلوژنی گونه‌ها از آنالیز Neighbor_joining استفاده گردید. در این بررسی ۱۵ گونه از Nudibranch که بیشترین شباهت را در توالی نوکلئوتیدها با گونه‌ی ایرانی داشتند از بانک جهانی ژن برای آنالیزهای فیلوژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۱) و گونه‌ی *Littorina littorea* از راسته‌ی Mesogastropoda بعنوان برون گروه در نظر گرفته شد .

جدول ۱: گونه‌های استفاده شده در مطالعه حاضر و شماره ثبت آنها در بانک ژنی که در آنالیز مولکولی این پژوهش استفاده شده است

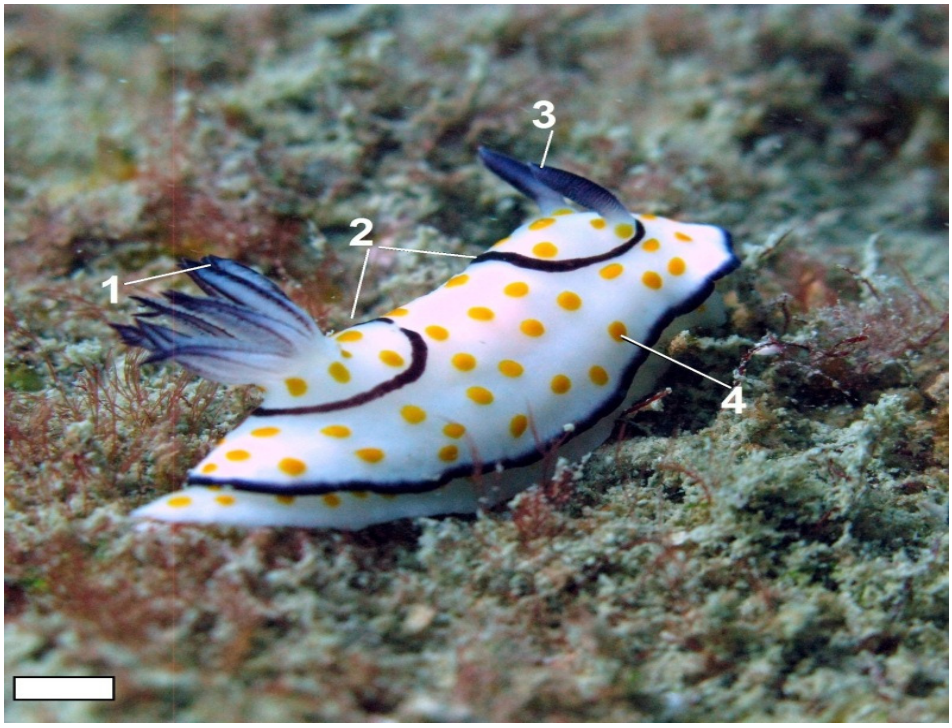
شماره بانک ژنی	نام گونه
KF ٤٠٨٢٢١	*Goniobranchus annulatus*, Iranian species
JQ ٧٢٧٨٤٧	*Goniobranchus leopardus*
JQ ٧٢٧٨٤٥	*Goniobranchus hintuanensis*
JQ ٧٢٧٨٥٩	*Goniobranchus vibratus*
EF ٥٣٥١١٩	*Chromodoris ambiguus*
EF ٥٣٥١٢٨	*Durvilledoris similaris*
JO ٧٢٧٨٨٦٧	*Hypselodoris bollandi*
JO ٧٢٧٨٨٦	*Hypselodoris apolegma*
EF ١٤٢٨٧٩	*Tambja blacki*
EF١٤٢٨٦٥	*Tambja olivaria*
EF ١٤٢٨٦٨	*Tambja morosa*
AY ٣٤٥٠٣٨	*Tambja ceutae*
DQ ٢٣٠٩٩٩	*Tambja* sp.
EF ١٤٢٨٧٢	*Tambja eliora*
GQ ٢٩٢٩٣٦	*Austrodoris kerguelenensis*
GQ ٢٩٢٠٣٦	*Doris kerguelenensis*
GQ ٨٤٥١٨٣	*Littorina littorea* (out group)

نتایج

با بررسی ایستگاههای مختلف در خلیج چابهار مشخص گردید که نمونه برهنه آبشش مورد مطالعه فقط در ایستگاه اسکله شهید کلانتری حضور دارد. بررسی مورفولوژیک گونه‌ی برهنه آبشش از سواحل جنوب شرقی ایران نشان داد که این

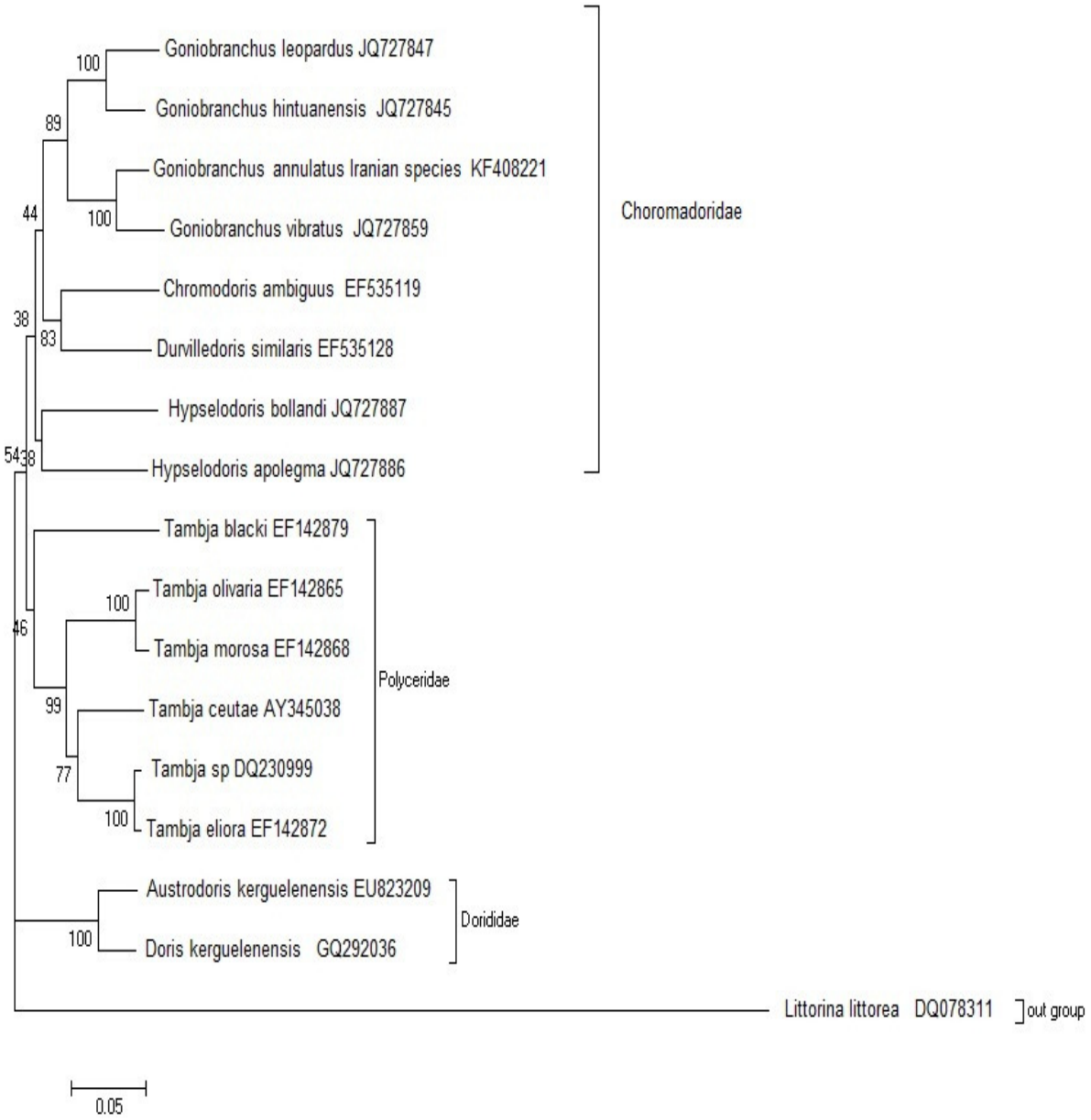
[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

گونه بدنی سفید با لکه‌های بزرگ زرد متمایل به نارنجی و طولی در حدود ۱۰۰ میلیمتر (۱۰ سانتیمتر) دارند، دو حلقه به رنگ بنفش یکی در اطراف آبشش‌ها و دیگری در اطراف رینوفورها قرار گرفته است (شکل ۱). بنابراین به عنوان گونه‌ی *Goniobranchus annulatus* شناسایی گردید که جز برهنه آبششان و در خانواده‌ی Chromodorididae Bergh, 1891 قرار گرفته است. نام مترادف (Synonym) گونه *G. annulatus* گونه *Chromodoris annulata* Eliot,1904 می‌باشد گونه *Chromodoris annulata* قبلا نیز در جزیره‌ی کیش و قشم مشاهده شده است (رضایی، ۱۳۸۸)، اما توالی ژنتیکی آن در بانک ژنی ثبت نشده است و نتوانستیم از لحاظ ژنتیکی گونه‌ی *Goniobranchus annulatus* ساحل چابهار را با گونه‌ی *Chromodoris annulata* یا *G. annulatus* دیگر نقاط مقایسه کنیم. بررسی مولکولی گونه‌ی ایرانی و ثبت توالی ژنتیکی در بانک ژنی و مقایسه درخت فیلوژنی توسط تست Neighbor_joining مشخص شد که گونه موجود در آبهای ساحلی چابهار از نظر توالی ژنتیکی شبیه به گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* Pease, 1860 است. این گونه برای اولین بار در سواحل هاوایی مشاهده شده است. درخت فیلوژنی ترسیم شده (شکل ۲) سه خانواده از برهنه آبششان را نشان می‌دهد که گونه‌ی مورد مطالعه ایرانی جز خانواده‌ی Chromodorididae تقسیم‌بندی شده است و با گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* با حمایت ۱۰۰ درصد بوت استرپ در گروه خواهری قرار گرفته‌اند.



شکل ۱: گونه‌ی *Goniobranchus annulatus* از سواحل زیر جزر و مدی خلیج چابهار. مقیاس اندازه گیری = ۱ سانتیمتر .
نقاط مشخص شده روی شکل: ۱-آبشش‌ها ۲- حلقه‌های بنفش ۳- رینوفورها ٤- لکه‌های زرد روی سطح پشتی بدن.
(عکس در آبهای زیر جزر ومدی توسط کلبه غواصی ساحل هتل لیپار _ چابهار گرفته شده است)

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]



شکل ۲ : درخت فیلوژنی خانواده های برهنه آبششان براساس توالی ژنی قسمتی از ژن COI با استفاده از آنالیز NJ. اعداد بوت استرپ با replication 1000 را نشان می‌دهد. گونه *Littorina littorea* بعنوان برون گونه در نظر گرفته شده است. گونه ایرانی با نام *Goniobranchus annulatus* Iranian species مشخص شده است.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

بحث

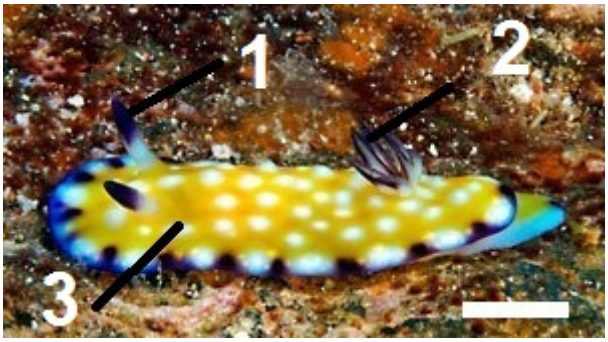
مطالعه حاضر اولین مطالعه مولکولی جنس *Goniobranchus annulatus* در سواحل چابهار در ایران است. در این پژوهش روابط فیلوژنتیکی بین ۱۵ گونه از افراد خانواده‌ی Nudibranchia مورد مطالعه قرار گرفت و براساس آنالیز فیلوزنتیکی NJ همه‌ی این گونه‌ها یک روابط فیلوژنی منوفایلتیک از برهنه آبششان Dorid را نشان دادند . در شکل ۲، روابط خویشاوندی بین این dorid‌ها را نشان می‌دهد.

مطالعات اخیر کلادیستیکی انجام شده بر Nudibranchia، منوفایلتیک بودن این گروه را مورد بررسی قرار داده است (Wägele, 1989; Wägele & Willan, 2000) و با نظریه‌های مشابه منوفایلتیک بودن این گروه تایید شد. همچنین Wollscheidو Wägele (۱۹۹۹) با مطالعه توالی ژنومی 18S rDNA ۵۳ گونه از شکم‌پایان که شامل ۱۹ تاکسون از برهنه آبششان می‌باشد این نظریه را تایید کرده است .در حالیکه Thollesson (۱۹۹۹a) با مطالعه منطقه ژنی 16S rDNA درحدود ۳۰ گونه از شکم‌پا، پارافایلتیک این گروه را تایید کرده است . در سال‌های اخیر دو گروه اصلی Cladobranchia و Anthobranchia در Nudibranchia شناسایی شده است (Wollscheid *et al.*, 2001). Wollscheid و Wägele (1999) منوفایلتیک بودن این دو گروه را به اثبات رساندند.گونه مورد مطالعه در گروه Anthobranchia قرار گرفته است. گونه‌ی ایرانی (*G. annulatus*) از نظر توالی ژنی بیشترین شباهت را به گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* دارد و با گونه‌های دیگر این جنس شباهت مورفولوژیکی و ژنتیکی زیادی دارد و در درخت فیلوژنی NJ ترسیم شده همگی در خانواده‌ی Chromodorididae قرار گرفته‌اند. Chromodorididae خانواده‌ی بزرگی از برهنه آبششان با رنگها و اشکال متنوع می‌باشد که پراکنش گسترده در اقیانوس‌های سراسر جهان دارند.

Turner و Wilson (۲۰۰۸) با مطالعه توالی ژنومی 18S rDNA, 16S rDNA و COI پارافیلی بودن جنس‌های این خانواده (*Hypselodoris*، *Mexichromis*، *Chromodoris* و *Glossodoris*) را گزارش دادند. گونه‌های جنس *Goniobranchus* با یک بوت استرپ ۸۹ درصد در حالت منوفایلتیک و در یک کلاد قرار گرفته‌اند و همچنین از لحاظ ریخت شناسی شباهت بسیار نزدیکی بهم دارند. گونه‌ی ایرانی از لحاظ مورفولوژیکی هم به گونه‌های دیگر *Goniobranchus* در کلاد Chromodorididae شباهت زیادی دارد. در این کلاد بیشترین شباهت چه از لحاظ ژنتیکی چه از لحاظ مورفولوژیکی بین گونه ایرانی (*G. annulatus*) و گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* دیده شده است. البته تفاوت‌هایی مورفولوژیکی هم بین این دو دیده می‌شود، گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* سطح پشتی به رنگ زرد روشن با لکه‌های سفید دارد، انتهای رینوفورها بنفش تیره است، آبششها سفید هستند اما حاشیه‌ی ارغوانی دارند (شکل ۳).

بدین ترتیب این گونه را می‌توان از دیگر chromodoridهایی که لکه‌های زرد و رینوفور و آبششش‌های بنفش دارند تشخیص داد. گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* از گونه‌های روز فعال می‌باشد و در مناطق محافظت شده معتدل، در بین صخره‌ها در عمق ۲۴-۱ متر دیده می‌شوند. در بعضی موارد نادر در مناطق بین جزر و مدی در اعماق خیلی کم دیده می‌شوند (Bertsch & Johnson, 1982) . همانطور که در بالا ذکر شد گونه‌ی *Chromodoris annulata* که در سواحل کیش و قشم نیز مشاهده شده است (شکل ۴) Synonym با گونهی *Goniobranchus annulatus* از سواحل چابهار می‌باشد و شباهت مورفولوژیک زیادی با هم دارند. اما تفاوت‌هایی هم دارند با بررسی‌های مورفولوژیک که انجام شد مشخص گردید که تعداد لکه‌های زرد روی سطح پشتی سفید گونه چابهار از گونه‌ی مشاهده شده در کیش و قشم بیشتر است، همچنین دو حلقه‌ی بنفش اطراف رینوفورها و آبششها در گونه‌ی کیش و قشم توسط یک خط بنفش بهم اتصال دارند، اما گونه‌ی چابهار دو حلقه‌ی بنفش کاملا از هم جدا می‌باشند(شکل های ۳و ۴).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]



شکل ۳: گونه‌ی *Goniobranchus vibratus* درسواحل هاوایی تفاوت های مورفولوژیک مشخصی با گونه تاکسون خواهری یعنی *G. annulatus* (شکل ۲) از ایران را نشان می دهد. معیار سنجش= ۱ سانتیمتر.نقاط مشخص شده روی شکل : ۱- رینوفورها با انتهایی به رنگ بنفش تیره ، ۲- آبشش های سفید رنگ با حاشیه ی ارغوانی ، ۳- لکه‌های سفید روی سطح پشتی بدن (www.marinelifephotography.com)

شکل ٤: گونه‌ی *Chromodoris annulata* از سواحل زیر جزر و مدی جزیره کیش و قشم که مترادف گونه *G. annulatus* است . مقیاس اندازه‌گیری = ۱ سانتیمتر (عکس از حمید رضایی www.nudipixel.net/locations/country/ir)

دو گونه‌ی *Hypselodoris bollandi* و *H .apolegma* که در درخت فیلوژنی ترسیم شده (شکل ۲) در یک حالت منوفایلتیک با گونه ی *Goniobranchus annulatus* می‌باشند، در یک کلاد خواهری قرار گرفته‌اند و از لحاظ مورفولوژیک شباهت بسیار نزدیکی بهم دارند. هر چند گونه‌های جنس *Hypselodoris* و گونه‌های *Chromodoris ambiguus* و *Durvilledoris similaris* در یک کلاد خواهری قرار نگرفته‌اند اما روابط خویشاوندی نزدیکی را نشان می‌دهند و در کلاد نزدیک بهم قرار گرفته‌اند. براساس مطالعه Rudman (۱۹۸۴) روابط خویشاوندی بین سه جنس *Hypselodoris*، *Durvilledoris* و *Chromodoris* به اثبات رسید، با تحقیقاتی که Thollesson (۱۹۹۹b) انجام داد، روابط خویشاوندی بین *Chromodoris* و *Hypselodoris* را نسبت به خویشاوندی بین *Durvilledoris* و *Hypselodoris* نزدیکتر دانست. خانواده‌ی Polyceridae کلادی شامل گونه‌های جنس *Tambja* Burn, 1962. براساس رده‌بندی Bouchet و Rocroi

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

(۲۰۰۵) خانواده Polyceridae در کلاد Doridacea که این خود جز گروه Euctenidiacea در کلاد Nudipleura می‌باشد، قرار گرفته شد. Pola و سایرین (۲۰۰۶) با مروری دوباره بر رده بندی جنس *Tambja* و آنالیزهای فیلوژنتیک، منوفایلتیک بودن آن را رد کردند. این کلاد با کلاد Chromodorididae در حالت منوفایلتیک قرار گرفته‌اند. خانواده‌ی Dorididae (Rafinesque, 1815) یک کلاد منوفایلتیک و شامل دو گونه‌ی *Austrodoris kerguelenensis* و *Doris kerguelenensis* می‌باشد که این دو گونه با حمایت ۱۰۰ درصد بوت استرپ در گروه خواهری قرار گرفته‌اند و باکلاد Chromodorididae منوفایلتیک است.

تشکر و قدردانی

کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار انجام شده است که بدین وسیله از زحمات مسئولین این بخش بویژه جناب آقای مهندس زاده عباس مسئول محترم آزمایشگاه سپاسگزاری میشود.

منابع

Bertsch H. and Scott J., 1982. Three new species of dorid nudibranchs (Gastropoda: Opisthobranchia) from the Hawaiian Islands. The Veliger, 24(3):208-218.

Boettger C., 1955. Die Taxonomie der euthyneuren Schnecken. Zoologischer Anzeiger, 18:253-280.

Bouchet P. and Rocroi J.P., 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. International. Journal of Malacology, 47(1-2): 257-267.

Dinapoli A., 2009. Phylogeny andevolution of the Heterobranchia (Mollusca, Gastropoda). Frankfurt am Main. Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen. 176P.

Galil B.S., Gershwin L.A., Douek J. and Rinkevich B., 2010. *Marivagia stellatagen*. et sp. nov. (Scyphozoa: Rhizostomeae: Cepheidae), another alien jellyfish from the Mediterranean coast of Israel. Aquatic Invasions, 5(4):331–340.

Guido T. and Poppe Sheila P.T., 2006. The new classification of gastropods according to Bouchet & Rocroi, 2005; Philippines, Lapu City, Visaya 11P.

Hall T.A., 1999. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence aligment editor and analysis for Windows 95/98/NT. Nucleic Symposium Series (London), 41:95-98

Haszprunar G. and Huber G., 1990. On the central nervous system of Smeagolidae and Rhodopidae, two families questionably allied with the Gymnomorpha (Gastropoda: Euthyneura). Animal Science and Zoology, 220:185-199.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. and deWaard J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceeding of the Royal Society of London, B, 270(1512):313–321.

Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G. and Gibson T.J., 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends. Biochemistry Science, 23:403–405.

Jörger K. M., Stöger I., Kano Y., Fukuda H., Knebelsberger T. and Schrödl M., 2010. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. BMC Evolutionary Biology, 10:320-323.

Kumar S., Tamura K. and Nei M., 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. Computer Applications in the Biosciences, 10(2):189–91.

Minichev Y.S., 1970. On the origin and system of nudibranchiate (Mollusks, Gastropoda,

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

Opisthobranchia). Monitore Zoologico Italiano, 4:169-182.

Pelseneer P., 1893-1894. Recherches sur divers opisthobranches. Memoires couronnes des Savants strangers publics par I'Academie Royale des Sciences des Lettres et des Beaux - Arts de Belgique, 53:1-157.

Pola M., Cervera J.L. and Gosliner T.M., 2006. Taxonomic revision and phylogenetic analysis of the genus *Tambja* Burn, 1962 (Mollusca, Nudibranchia, Polyceridae), Zoologica Scripta, 35(5):491-530.

Rudman W.B., 1984. The Chromodorididae (Opisthobranchia: Mollusca) of the Indo-West Pacific: A review of the genera. Zoological Journal Of The Linnean Society, 81:115–273.

Schmekel L., 1985. Aspects of evolution within the opisthobranchs. *In*: Wilbur KM (ed) The Mollusca. London .Academic Press, 221-267P.

Tardy J., 1970. Contribution à l'etude des métamorphoses chez les nudibranches. Annales des Sciences Naturelles Zoologie Biology, 12: 299-370.

Thiele J., 1929-1935. Handbuch der Systematischen Weichtierkunde, 1154 P.

Thollesson M., 2000. Increasing fidelity in parsimony analysis of dorid nudibranchs by differential weighting, or a tale of two genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 16(2): 161–172.

Thollesson M., 1999a. Phylogenetic analysis of dorid nudibranchs (Gastropoda Doridacea) using the mitochondrial 16S rRNA gene. Journal of Molluscan Studies, 65: 335-353.

Thollesson M., 1999b. Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16S rRNA gene. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 266: 75–83.

Thompson T.E., 2009. Feeding in nudibranch larvae. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 38(2):239-248.

Turner L.M. and Wilson N.G., 2007. Polyphyly across oceans: A molecular phylogeny of the Chromodorididae (Mollusca, Nudibranchia). Zoologica Scripta 37(1):23–42.

Wägele H., Willan R.C., 2000. On the phylogeny of the Nudibranchia. Zoological Journal of The Linnean Society, 130:83–181.

Wägele H., 1989. Die Gattung Bathydoris Bergh, 1884 (Gnathodoridacea) im phylogenetischen System der Nudibranchia (Opisthobranchia, Gastropoda). Zeitschrift Fur Zoologische Systematik Und Evolutionsforschung, 27:273–281.

Wollscheid E. and Wägele H., 1999. Initial results on the molecular phylogeny of the Nudibranchia (Gastropoda, Opisthobranchia) based on 18S rDNA data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 13: 215-226.

Wollscheid-Lengeling E., Boore J., Brown W. and Wägele H., 2001. The phylogeny of Nudibranchia (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca) reconstructed by three molecular markers. Organisms Diversity & Evolution, 1:241–256.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1392.22.2.6.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110121]

The first phylogenetic study of *Goniobranchus annulatus* (Mollusca : Nudibranchia) in subtidal area of Chabahar, Oman Sea, Iran:, based on sequence of cytochrome oxidase C subunite I gene

Attaran Fariman G.* and Moosavipoor Y.

gilan.attaran@gmail.com

Chabahar Maritime University (CMU), Faculty of Marine Sciences, Department of Marine Biology
Chabahar, Iran

Received: March 2013 Accepted: July 2013

Keywords: Gasteropoda, CO1, Chabahar coast

Abstract

Nudibranches are the largest group of Hetrerobranches, (a sub-branch of Opisthobranchia) and are widespread and cosmopolitan species. They vary in shape and colors and occur in all waters from intertidal to deep sea zones and from polar to the tropics regions. Nudibranches are subdivided in two main groups including Anthobranchia and Cladobranchia. In the present study, based on morphology the svudied species was identified as *Goniobranchus annulatus* that belong to Anthrobranchia group. In molecular analysis the sequences of the partial mitochondrial COI gene of *Goniobranchus annulatus* species from Iran with 15 similar sequence of nudibrnaches from genbank were compared. Phylogenetic based on Neighbor_joining analyze showed a monophyly relationships between families of nudibranches and also revealed that *Goniobranchus vibratus* is a sister taxa to the *Gonidbranchus annulatus* from Iran *Goniobranchus annulatus* with 100% bootstrap support.

*Corresponding author